

文章编号: 1006-1126-2017(1)-0102-05

# 叶绿素荧光动力学技术在胁迫环境下的研究进展

胡丰姣, 黄鑫浩, 朱凡, 邹志刚, 刘俊文, 郑芬

(中南林业科技大学生命科学与技术学院, 湖南 长沙 410004)

**摘要:** 叶绿素荧光动力学涵盖大量的光合作用过程信息。叶绿素荧光动力学技术作为一种快速、简便、精确且无损伤的新技术, 在植物光合生理生态及胁迫生理生态等研究领域得到了较快的普及和广泛的应用。本研究介绍了快速叶绿素荧光诱导动力学曲线、叶绿素荧光分析相关参数、生物学意义以及该技术在胁迫环境中应用。

**关键词:** 叶绿素荧光; 光合系统II(PS II); 环境胁迫

**中图分类号:** S718.43 **文献标识码:** A

## Application of Chlorophyll Fluorescence Analysis in Environmental Stress

HU Feng-jiao, HUANG Xin-hao, ZHU Fan, ZOU Zhi-gang, LIU Jun-wen, ZHENG Fen

(College of Life Science and Technology, Central-South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China)

**Abstract:** The kinetics of chlorophyll fluorescence included rich information on the process of photosynthesis. By the means of rapidness, simpleness and convenience, accurateness and non-invasion, chlorophyll fluorescence kineticstechnique has been being popularized quickly and applied widely to physiological ecology of plants' photosynthesis and environmental stress. The research introduced the curveofrapid chlorophyll fluorescence induction kinetics, the relevant parameters of chlorophyll fluorescence analysis and their biologicalmeanings, and the application of the technique of chlorophyll fluorescence induction in environmental stress.

**Keywords:** chlorophyll fluorescence; photosynthetic system II; environmental stress

全球气候变化导致一些极端气候, 如低温、高温、干旱、洪涝, 以及生态破坏、环境污染, 这些都严重影响所在区域植物的生理状况。叶绿素荧光动力学为研究植物光合作用过程中激发能的利用途径、光合系统状态等对胁迫环境的响应提供大量的信息, 且能够对光合器官进行“快速无损探查”。叶绿素荧光技术与光合作用过程紧密相关, 光合作用某个过程对逆境的响应能够利用该技术测量。随着光合理论的深入研究, 近年

来, 叶绿素荧光动力学获得了迅速的发展<sup>[1,2]</sup>。本文对叶绿素荧光技术在胁迫环境下的利用等方面进行综述, 供国内相关科学工作者参考, 推动国内叶绿素荧光技术的研究进程。

### 1 叶绿素荧光技术简介

叶绿素荧光动力学技术在测定叶片光合作用过程中光系统对光能的吸收、分配等方面具有独特的作用, 因为此技术能够反映叶片内部的“内

收稿日期: 2017-01-21

基金项目: 国家林业局“948”项目(2014-4-62); 湖南省财政厅研究经费资助项目

第一作者: 胡丰姣(1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 环境生态学。

通信作者: 朱凡(1973—), 女, 教授, 长期从事环境生态学研究。

在性”特点<sup>[3-5]</sup>。荧光随时间变化的曲线称为叶绿素荧光诱导动力学曲线<sup>[6]</sup>。

从O点到P点的荧光上升过程称为快速叶绿素荧光诱导动力学曲线<sup>[7]</sup>, 能反映PSII的原初光化学反应及光合机构的结构和状态等的变化。由于调制式荧光仪主要通过测量光合作用光反应阶段的情况来反映光合作用的卡尔文循环等反应启动后的光能捕获、转化及利用情况, 而关于卡尔文循环启动前PSII的光化学变化所获取的信息较少; 且对于从O-P上升过程中荧光变化信息量的获得, 由于时间分辨率及信噪比的限制, 调制式荧光仪远不及连续激发式荧光仪。所以获取快速叶绿素荧光诱导曲线的信息主要用连续激发式荧光仪<sup>[7]</sup>。

从P点到T点的下降阶段包含大量的光合作用过程信息, 这是一个时间长且情况复杂的过程。它是光化学过程和非光化学过程共同作用的结果。随着光合碳代谢速率的上升, 荧光强度逐渐下降。而连续激发式荧光仪不能较好地反映此阶段信息, 上世纪80年代脉冲振幅调制式荧光仪的

出现弥补了连续激发式荧光仪的不足<sup>[8]</sup>。

## 2 叶绿素荧光技术原理

植物光合机构吸收光能主要是叶绿体中天线色素。吸收到光能的天线色素从基态跃迁到激发态, 产生的激发能有三个可能的命运<sup>[9-12]</sup>: (1) 通过天线色素分子传递到反应中心, 引起原初光化学反应, 进而引起光合碳同化; (2) 直接转化为热被耗散; (3) 以光能(此光能的波长大于所吸收的光的波长)的形式释放, 产生荧光现象。因为这三者之间的关系是相互竞争的, 所以光合作用的变化能够利用荧光的变化来探测<sup>[6]</sup>。

## 3 叶绿素荧光技术在胁迫环境中的应用

### 3.1 快速叶绿素荧光诱导动力学曲线在胁迫环境中的应用

通过对植物的JIP-test分析参数(表1)和快速叶绿素荧光诱导曲线的分析, 能够知道胁迫因子对植物光系统II(PS II)原初光化学反应的影响。

表1 JIP-test分析参数  
Tab. 1 The main parameters of JIP-test analysis

	$ABS/RC=M_0 \setminus V_j \setminus \Phi_{p0}$	单位反应中心吸收的光能
比活性参数 ( $Q_A$ 出在可还原时, 单位 PSII 反应中心的活性)	$TR_0/RC= M_0 \setminus V_j$	单位反应中心捕获的用于还原 $Q_A$ 的能量 (在 $t=0$ 时)
	$ET_0/RC= M_0 \setminus V_j \setminus \psi_0$	单位反应中心捕获的用于电子传递的能量 (在 $t=0$ 时)
	$DT_0/RC=(ABS/RC)-(TR_0/RC)$	单位反应中心消耗的的能量 (在 $t=0$ 时)
	$\Phi_{p0}=TR_0/ABS=[1-F_0/F_M]$	最大光化学效率 (在 $t=0$ 时)
量子产额或能量分配比率	$\psi_0=ET_0/TR_0=(1-V_j)$	反应中心捕获的激子中用来推动电子传递到电子传递链中超过 $Q_A$ 的其他电子受体的激子占用来推动 $Q_A$ 还原激子的比率 (在 $t=0$ 时)
	$\Phi_{E0}=ET_0/ABS=[1-(F_0/F_M)] \setminus \psi_0$	用于电子传递的量子产额 (在 $t=0$ 时)
	$\Phi_{D0}=1-\Phi_{F0}=(F_0/F_M)$	用于热耗散的量子比率 (在 $t=0$ 时)

Heerden<sup>[13]</sup>研究不同处理天数、黑暗情况下低温对不同基因型大豆 (*Bradyrhizobium japonicum*) 生长的影响时发现两种基因型的大豆的量子产率  $\Phi_{P0}$ 、 $\Phi_{E0}$ 、 $\psi_0$  都随着胁迫时间的延长呈现先降低后升高的趋势,  $\Phi_{D0}$  呈现先升高后降低的趋势, 这表明环境胁迫初期以热能耗散的能量增加, 而用于电子传递的量子产额减少, 且随着胁迫时间的延长  $\Phi_{P0}$ 、 $\Phi_{E0}$ 、 $\psi_0$  和  $\Phi_{D0}$  都发生了相反的趋势, 这表明胁迫时间的延长, 这两种基因型的豌豆 (*Vicia ramuliflora*) 的抗性都有些许的恢复。此外, Heerden<sup>[13]</sup>也研究比活性参数 ( $Q_A$  处在可还原态时, 单位 PS II 反应中心的活性)  $ET_0/RC$ 、 $ABS/$

$RC$ 、 $TR_0/RC$ 、 $PIABS$  以及表观能量流参数  $ET_0/CS$ 、 $ABS/CS$ 、 $TR_0/CS$  和反应中心密度参数  $RC/CS$  在此胁迫条件下的变化情况, 发现它们呈现的趋势不尽相同, 表明了胁迫对植物光合器官天线色素、能量传递、电子传递的影响不同。其实在此之前, Gert<sup>[14]</sup>等在研究光胁迫对山茶花 (*Camellia japonica*) 叶片 PS II 的结构和功能的影响时也测定了 Heerden 测定的参数, 他们的结果是类似的。Heerden<sup>[15]</sup>除了研究黑暗情况下低温对不同基因型大豆生长的影响外, 还研究了添加硝酸盐后黑暗、低温对两种基因型的大豆固氮作用的影响。结果表明添加硝酸盐能够减轻低温对 PSII 的功能

的影响,且发现完全展开的叶片和正在展开的叶片对黑暗、低温的响应不同:在黑暗、低温情况下,正在展开的叶片随着时间的延长其能恢复到正常的状态,而已经完全展开的叶片则不能恢复到正常状态,表明低温对两种基因型大豆的影响主要是在叶片完全张开时。此外,他还发现PIABS、FV/FM之间的差别,PIABS在寒冷且黑暗的胁迫环境下比FV/FM敏感、灵敏。

当植物生长受到环境胁迫时,其典型的快速叶绿素荧光诱导动力学曲线的形状就会发生变化。例如Srivastava<sup>[16]</sup>通过快速叶绿素荧光诱导动力学曲线研究高温对豌豆光系统II的天线结构和电子传递的影响时<sup>[16]</sup>,发现:高温胁迫后O点升高,J、I、P点降低了很大,且每段的曲线也由陡峭变得平缓;且当胁迫增强时,典型的OJIP曲线会变换为OKJIP:当胁迫温度为42℃时,O点和J点之间会出现一个新点K;当胁迫温度为48℃。C时,K点会变得更加明显。K点的出现使J点的变化时间缩短,且在K点后面出现一个很大的凹谷。这些变化表明电子传递速度及J、I、P点各点电子受体的主要状态的量受到很大的影响。Appenroth<sup>[17]</sup>等在研究Cr<sup>6+</sup>对紫背萍(*Spirodela polyrhiza*)光合器官的影响时发现当胁迫存在时曲线由陡峭变得平缓,说明电子传递受到影响。此外,Susplugas<sup>[18]</sup>等研究Cr<sup>6+</sup>对紫背萍不同生长阶段的影响时发现Cr<sup>6+</sup>对新鲜绿叶的影响显示一条正常的快速叶绿素荧光诱导曲线,而对带芽的老叶和芽都显示的是一条明显的OKJIP曲线,且芽的曲线没有显著的J、I点,表明Cr<sup>6+</sup>对紫背萍芽阶段的电子传递的影响很大。国内有很多学者也用此方法对不同胁迫进行了研究,如中科院新疆生态与地理研究所潘响亮研究含铋(Sb)矿井水对玉米(*Zea mays*)光合作用的影响及玉米对铋(Sb)的吸收<sup>[19]</sup>;西北农林科技大学的张葑研究干旱对平邑甜茶(*Lithocarpus polystachyus*)叶片光合机构的伤害机制等<sup>[20]</sup>。对此,Srivastava<sup>[16]</sup>认为(1)P点荧光强度的降低可以通过加入二氯苯基二甲脲(DCMU, dichlorobenzene dimethyl urea)恢复,所以P点的降低的原因是PSII供体端的电子传递受到抑制;(2)由于高温胁迫下水的氧化分解受到破坏,电子向反应中心的持续供应减少。其初,由于QA<sup>-</sup>的存在,叶绿素荧光强度变大;但是随后QA<sup>-</sup>将电子传递给QB,由于缺乏电子的供给,荧光强度再次降低,所以出现了K点;(3)K后面的大凹谷是由于水的氧

化分解受到抑制,致使PSII反应中心积累大量的P680<sup>+</sup>,所以大凹谷反映的是P680<sup>+</sup>的积累情况。

### 3.2 叶绿素荧光参数在胁迫环境中的应用

脉冲振幅调制式荧光仪也可以测定叶片光合作用机构的很多参数(表2),它们也反映很多光合机构的信息且也得到广泛的应用。Ouzounidou<sup>[21]</sup>在研究不同浓度的Cu<sup>2+</sup>对遏蓝菜(*Thalasspi arvense*)PSII叶绿素荧光强度的影响时发现Fv'/Fm'、φPSII、qP都随着Cu<sup>2+</sup>的浓度的增大而降低,而qN则增加。这表明随着Cu<sup>2+</sup>浓度的增大,Cu<sup>2+</sup>对PSII的抑制作用、非光化学淬灭的作用增强,使PSII的光合活性降低和吸收光能的利用率降低;多余的激发能以热能的形式散发掉,避免过多的激发能对植物产生二次伤害。此外,还发现Fm、Fm'、Fv'的值也发生明显的变化,表明电子传递也受到影响。Ouzounidou<sup>[22]</sup>在之前的研究中还发现叶片光合作用活性参数Rfd在160 μM时减少了88%,即光合作用活性受到极大的抑制。Maksymiec<sup>[23]</sup>研究Cu<sup>2+</sup>对红花菜豆(*Phaseolus coccineus*)不同生长阶段及处理时间的影响、Skorzynska<sup>[24]</sup>研究Cd<sup>2+</sup>对红花菜豆的影响时呈现的结果以及Krupa等<sup>[25]</sup>研究Cd<sup>2+</sup>对冬黑麦(*Lolium perenne*)光合作用组织的影响时也都运用此参数。

表2 调制荧光主要的参数

Tab. 2 The main parameters of modulation fluorescence

$F_0$	暗适应下初始荧光产量
$F_m$	暗适应下最大荧光产量
$F_v = F_m - F_0$	可变荧光
$F_v/F_m$	最大光化学效率
$F_v/F_0$	PS II潜在光化学活性
$F_0'$	光适应下初始荧光
$F_m'$	光适应下最大荧光
$F_v' = F_m' - F_0'$	光适应下可变荧光
$F_v'/F_m'$	光适应下PS II最大光化学效率
$F_t$ (或 $F_s$ )	稳态荧光产量
$\phi_{PSII} = (F_m' - F_t) / F_m'$	PS II实际光化学效率
$qP = (F_m' - F_t) / (F_m' - F_0')$	光化学淬灭系数
$1 - qP$	表示PS II反应中心的关闭程度
$qN = (F_m - F_m') / (F_m - F_0')$	非光化学淬灭系数
$NPQ = (F_m - F_m') / F_m' = F_m/F_m' - 1$	非光化学淬灭
$ETR = \phi_{PSII} \times \text{absorbed PFD} \times 0.5$	PS II电子传递速率
$F_{m,r} = 1 - qP/qN$	可恢复的荧光产量
$(F_m - F_{m,r}) / F_{m,r}$	不可逆的光化学淬灭产率

## 4 展望

随着光合作用过程的深入研究, 其理论已发展的日趋完善并已成为一门较为系统的科学。光合理论的发展促进叶绿素荧光动力学技术的发展, 叶绿素荧光动力学技术亦促进光合理论的完善, 二者相辅相成, 为我们研究胁迫环境对植物的影响提供了新技术。此技术快速和无损伤的特性, 使其除在上述胁迫被广泛应用外, 也被广泛应用在遗传育种<sup>[26]</sup>、病虫害防治<sup>[27]</sup>及污染检测<sup>[28]</sup>和生态恢复物种筛选中。然而该技术还不能很好地反映光系统 II 中水氧化分解的过程、S 态转换机制及用于合成 ATP 的能量和电子传递及用于合成 NADPH 的能量。相信随着研究的不断深入和测量仪器的不断改进, 该技术将会有突破。

### 参考文献

- [1] GENTY B, BRIANTAIS J M, BAKER N R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1989, 990(1): 87-92.
- [2] SCHREIBER U, BILGER W, NEUBAUER C. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis [M]. *Ecophysiology of Photosynthesis*. Springer Berlin Heidelberg, 1995: 49-70.
- [3] GENTY B, BRIANTAIA J M, BAKER N R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1989, 990(1): 87-92.
- [4] SCHREIBER U, SCHLIWA U, BILBER W. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer [J]. *Photosynthesis Research*, 1986, 10(1-2): 51-62.
- [5] SCHREIBER U, BILGER W, NEUBAUER C. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis [M]. *Ecophysiology of Photosynthesis*. Springer Berlin Heidelberg, 1995: 49-70.
- [6] 许大全. 光合作用效率 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002.
- [7] 李鹏民, 高辉远, STRASSER R J. 快速叶绿素荧光诱导动力学分析在光合作用研究中的应用 [J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2005, 31(6): 559-566.
- [8] 郭军伟, 魏慧敏. 叶绿素荧光分析方法理论基础参数意义和其应用 [J]. 北京: 中国科技论文在线, 2006, 7(3): 1-18.
- [9] MALKIN R, NIVOGI K. Photosynthesis [C]. Buchanan B, Gruissem W, Jones R (eds.). *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, 2000: 568-628.
- [10] ROHACEK K. Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships [J]. *Photosynthetica*, 2002, 40(1): 13-29.
- [11] ROHACEK K, BARTAK M. Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications [J]. *Photosynthetica*, 1999, 37(3): 339-363.
- [12] STRASSER R J, TSIMILLI-MICHAEL M, SRIVASTAVA A. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient [M]. *Chlorophyll a Fluorescence*. Springer Netherlands, 2004: 321-362.
- [13] HEERDEN P D R V, TSIMILLI-MICHAEL M, KRUGER G H J, et al. Dark chilling effects on soybean genotypes during vegetative development: parallel studies of CO<sub>2</sub>, assimilation, chlorophyll a, fluorescence kinetics O-J-I-P and nitrogen fixation [J]. *Physiologia Plantarum*, 2003, 117(4): 476-491.
- [14] GERT H J, KRUGER, MEROPE TM, RETO J, STRASSER. Light stress provokes plastic and elastic modifications in structure and function of photosystem II in camellia leaves [J]. *Physiologia Plantarum*, 2006, 101(2): 265-277.
- [15] HEERDEN P D R V, STRASSER R J, KRUGER G H J. Reduction of dark chilling stress in N<sub>2</sub>-fixing soybean by nitrate as indicated by chlorophyll a, fluorescence kinetics [J]. *Physiologia Plantarum*, 2004, 121(2): 239-249.
- [16] SRIVASTAVA A, GUISSSE B, GREPPIN H, et al. Regulation of antenna structure and electron transport in photosystem II of *Pisum sativum*, under elevated temperature probed by the fast polyphasic chlorophyll a, fluorescence transient: OKJIP [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1997, 1320(1): 95-106.
- [17] APPENROTH K J, STOCKEL J, SRIVASTAVA A, et al. Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrrhiza*, as probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurements [J]. *Environmental Pollution*, 2001, 115(1): 49-64.
- [18] SUSPLUGAS S, SRIVASTAVA A, STRASSER R J. Changes in the photosynthetic activities during several stages of vegetative growth of *Spirodela polyrrhiza*: effect of chromate [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2000, 157(5): 503-512.
- [19] PAN X L, ZHANG D Y, CHEN X, et al. Sb uptake and photosynthesis of *Zea mays* growing in soil watered with Sb

- mine drainage: an OJIP Chlorophyll Fluorescence Study [J]. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2010, 19(5): 981-987.
- [20] 张葳, 陈昌盛, 李鹏民, 等. 利用快速荧光、延迟荧光和 820nm 光反射同步测量技术探讨干旱对平邑甜茶叶片光合机构的伤害机制[J]. *植物生理学报*, 2013(6): 551-560.
- [21] OUZOUNIDOU G. The use of photoacoustic spectroscopy in assessing leaf photosynthesis under copper stress: correlation of energy storage to photosystem II fluorescence parameters and redox change of P700 [J]. *Plant Science*, 1996, 113(2): 229-237.
- [22] OUZOUNIDOU G. Changes in variable chlorophyll fluorescence as a result of Cu-treatment: dose-response relations in *Silene* and *Thlaspi* [J]. *Photosynthetica*, 1993, 29(3): 455-462.
- [23] MAKSYMIEC W, BASZYNSKI T. Chlorophyll fluorescence in primary leaves of excess Cu-treated runner bean plants depends on their growth stages and the duration of Cu-action [J]. *Journal of Plant Physiology*, 1996, 149(1): 196-200.
- [24] EWA SP, TADEUSZ B. Differences in sensitivity of the photosynthetic apparatus in Cd-stressed runner bean plants in relation to their age [J]. *Plant Science*, 1997, 128(1): 11-21.
- [25] KRUPA Z, MONIAK M. The stage of leaf maturity implicates the response of the photosynthetic apparatus to cadmium toxicity [J]. *Plant Science*, 1998, 138(2): 149-156.
- [26] MALDONADO R, PAVLOV S, GONZALEZ A, et al. Can machines recognise stress in plants? [J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2003, 1(1): 201-205.
- [27] BUENO M, FILLAT M F, STRASSER R J, et al. Effects of lindane on the photosynthetic apparatus of the cyanobacterium *Nabaena* [J]. *Environmental Science & Pollution Research*, 2004, 11(2): 98-106.
- [28] HERMANS C, SMEYERS M, RODRIGUEZ R M, et al. Quality assessment of urban trees: a comparative study of physiological characterisation, airborne imaging and on site fluorescence monitoring by the OJIP-test [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2003, 160(1): 81-90.